

Aus dem Pathologischen Institut
der Freien Universität Berlin im Klinikum Westend
Direktor: Professor Dr. med. V. Becker

**Einfluß der Lyophilisation auf die Aktivität und die
histochemische Darstellbarkeit der Oxytocinase**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

BERNHARD RÖMHILD
aus Berlin

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0025

Aus dem Pathologischen Institut
der Freien Universität Berlin im Klinikum Westend
Direktor: Professor Dr. med. V. Becker

Einfluß der Lyophilisation auf die Aktivität und die histochemische Darstellbarkeit der Oxytocinase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

BERNHARD RÖMHILD
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. V. Becker

Korreferent: Professor Dr. med. Hans Herken



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11.9.1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	3
EXPERIMENTELLER TEIL	7
METHODIK	
I. Oxytocinasenachweisreaktion im Schwangerenserum (Tuppy und Win- tersberger 1960)	7
II. Oxytocinasenachweisreaktion im Retroplazentarserum (Mikrometho- de Seelig 1970)	9
III. Histochemische Darstellung der Oxytocinase am Plazentaschnitt	12
IV. Einfluß der Lagerung auf die Oxytocinaseaktivität	14
V. Oxytocinaseaktivität im Schwan- gerenserum nach Lyophilisation	14
VI. Lyophilisation und Anreicherung der Oxytocinase im Retroplazentar- serum	14
VII. Einfluß der Lyophilisation auf die histochemische Darstellbarkeit der Oxytocinase	17
MATERIAL	18
ERGEBNISSE	19
I. Einfluß der Lagerung auf die Oxytocinaseaktivität	19
II. Einfluß der Lyophilisation auf die Oxytocinaseaktivität im Schwange- renserum	20
III. Einfluß der Lyophilisation auf die Oxytocinaseaktivität bei verschie- denen Reinigungsstufen	21
IV. Histochemische Darstellung der Oxy- tocinase vor und nach Lyophilisation	25
DISKUSSION	29
ZUSAMMENFASSUNG	36
LITERATURVERZEICHNIS	37

EINLEITUNG

Der Hypophysenhinterlappen speichert die im Hypothalamus gebildeten Hormone Vasopressin und Oxytocin und gibt sie unmittelbar in die Blutbahn ab.

Oxytocin und Vasopressin sind zyklische Nonapeptide bzw. Octapeptide, wenn man die Cysteinmoleküle 1 und 6 als ein Cystinmolekül ansieht. Beide Hormone (Abb. 1) unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz nur an den Positionen 3 und 8, was das Überlappen der physiologischen Wirkungen möglicherweise erklärt.

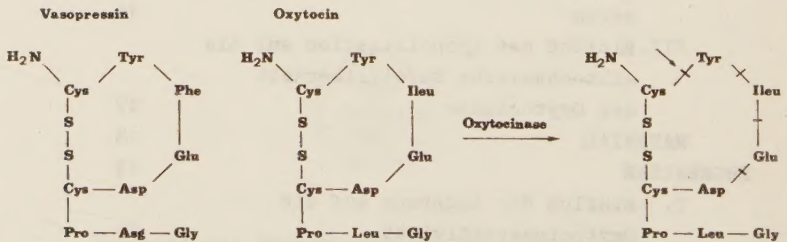


Abb. 1

Unter dem Einfluß von Oxytocin kommt es zur Kontraktion der glatten Muskulatur von Brustdrüse und Uterus. Offensichtlich ist Oxytocin beim Ingangkommen der Wehentätigkeit ursächlich beteiligt. Dieser Vorgang unterliegt einem bis jetzt nicht geklärten Regulationsmechanismus. Bei dem Wechselspiel verschiedener Faktoren sind ebenso beteiligt die zunehmende Bildung von Follikelhormon in der Plazenta, die verminderte wehendämpfende Wirkung des Gelbkörperhormons und die abnehmende Bildung des das wehenerregende Oxytocin hemmenden Enzyms: die O x y t o c i n a s e .

Das Oxytocin inaktivierende Prinzip wurde von Fekete (1930) entdeckt und von Werle und Effkemann (1941) als ein Oxytocin spaltendes Enzym angesehen.

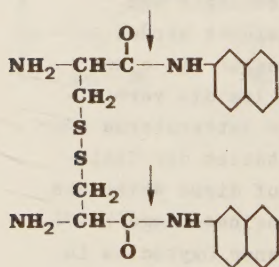
Das pH-Optimum liegt bei pH 6,5 und pH 7,5. Die Oxytocinase kommt nur im Serum schwangerer Frauen, nicht im Serum trächtiger Säugetiere vor. Die Oxytocinase steigt proportional zur Dauer der Schwangerschaft an, ist vom ersten Schwangerschaftsmonat bis einen Monat post partum nachweisbar und erreicht zum Geburtstermin ihre maximale Aktivität.

Die Aktivitätsbestimmung der Oxytocinase kann durch die Messung der Oxytocin Inaktivierung im biologischen Test sowie durch photometrische Bestimmung durch Oxytocinase beeinflusster Substratumssetzungen mit anschließenden Farbreaktionen durchgeführt werden. Page (1947) inkubierte Schwangerenserum mit einer definierten Oxytocinmenge und beurteilte die verbleibende Oxytocinaktivität am isolierten Rattenuterus oder die bei Oxytocingabe einsetzende Laktation der Kaninchenbrustdrüse. Indirekt konnte er auf diese Weise die im Schwangerenserum befindliche Oxytocinasemenge bestimmen, die einen Teil des vorgegebenen Oxytocins inaktiviert hatte.

Nach der Strukturaufklärung des Oxytocinmoleküls (Du Vigneaud 1953, Tuppy 1953) konnte dessen Abbaumecha-

nismus durch die Oxytocinase geklärt werden. Die Oxytocinase hydrolysiert die Peptidbindung zwischen N-terminalem Halbcystinrest und dem benachbarten Tyrosin (Tuppy und Nesvadba 1957). Untersuchungen von Sjöholm (1967) brachten weiterführende Ergebnisse. Neben der hydrolytischen Abspaltung am N-terminalen Halbcystinrest finden sich durch schrittweisen Abbau des Oxytocinmoleküls weitere Aminosäuren. Prolin und Leucin können nicht nachgewiesen werden, da die Iminogruppe des Prolins eine weitere Hydrolyse zu verhindern scheint. Für die Freisetzung des Cystins wird eine Verbindung von zwei teilweise abgebauten Peptidringen durch Umwandlung der Schwefelbrücken angenommen. Wegen dieser biochemischen Eigenschaften wird die Oxytocinase als Aminopeptidase bzw. Cystinaminopeptidase angesehen. Tuppy und Nesvadba (1957) erforschten die Substratspezifität der Oxytocinase *in vitro*. Sie untersuchten chromogene Aminopeptidasesubstrate (β -Naphthylamide von α -Aminosäuren), die wie das Peptidhormon Oxytocin

**L-Cystin-di- β -Naphthylamid
(CBNA)**



β -Naphthylamin

Oxytocinase

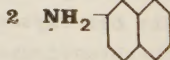


Abb. 2

N-terminale Halbcystinreste enthalten. L-Cystin-di- β -Naphthylamid (CBNA) (Abb. 2) erwies sich als geeignetes Substrat, da es durch Schwangerenserum ca. 13mal stärker als durch Normalserum gespalten wird, während andere Substrate, z.B. L-Leucin- β -Naphthylamid (LBNA), durch Schwangerenserum weniger stark hydrolysiert werden.

Die Bildungsstätte der Serumoxytocinase befindet sich im Syncytiotrophoblasten der Plazenta (Werle et al. 1941, Page 1946, Semm 1958), die der Gewebsoxytocinasen in den X-Zellen der Plazentarsepten (Ryden 1966). Analog zum Oxytocinasenachweis im Serum verwendet man die Substrate CBNA oder LBNA, bei denen β -Naphthylamin abgespalten und chromatographisch bestimmt wird, wobei es mit einem in der Substratlösung enthaltenen Diazosalz reagiert (Gomori 1954, Burstone und Folk 1956, Nachlas, Crawford und Seligman 1957, Seelig und Roemheld 1969). Tuppy und Wintersberger (1960) reicherten die Oxytocinase im Schwangerenserum an durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat und Rivanol mit anschließender Chromatographie auf Hydroxylapatit. Bei Lyophilisation (Gefriertrocknung) des hochgereinigten Materials fanden sie die vollständige

I n a k t i v i e r u n g d e s E n z y m s .

Bei auftretender Inaktivierung der Oxytocinaseaktivität durch Lyophilisation könnte dieses Phänomen zu einer spezifischen Hemmung der Oxytocinasereaktion am histologischen Schnitt ausgebaut werden. Tritt aber entgegen dieser Angaben keine Inaktivierung ein, so muß lyophilisiertes Plazentagewebe bei gleicher Färbetechnik, wie durch Nachlas et al. (1957) beschrieben, gleiche Resultate erbringen. Beeinflußt die Lyophilisation nicht die Oxytocinaseaktivität, so bringt sie bei Anreicherung des Enzyms aus Serum eine wesentliche Arbeitserleichterung mit sich.

EXPERIMENTELLER TEIL

METHODIK

I. Oxytocinasenachweisreaktion im Schwangerenserum nach der Methode von Tuppy und Wintersberger (1960)

Die Bestimmung der Oxytocinaseaktivität wird reduziert auf den Nachweis von β -Naphthylamin (Green, Tsou, Bressler und Seligman (1955) mit Hilfe einer modifizierten Bratton-Marshall-Methode (1939).

Bei diesem Nachweis wird das L-Cystin-di- β -Naphthylamid als Substrat verwendet. Es hat wie das Oxytocinmolekül einen N-terminalen Halbcystinrest. Oxytocinase spaltet hydrolytisch β -Naphthylamin ab (Abb. 2), das danach mit Natriumnitrit diazotiert wird. Das Diazoniumsalz wird mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Dieser Farbstoff wird photometrisch gemessen, sein Absorptionsmaximum liegt bei 580 nm. Bei der Umsetzung primärer aromatischer Amine (hier β -Naphthylamin) mit Natriumnitrit entstehen in mineralsaurer Lösung die entsprechenden Diazoniumsalze. Ein Überschuß von Natriumnitrit beeinflusst die Stabilität der Diazoverbindung ungünstig und wird mit Ammoniumsulfaminat aufgefangen. Bei der Diazotierung von β -Naphthylamin entsteht das Diazoniumsalz Naphthyldiazoniumchlorid.

Tabelle 1

Reaktionsansatz Oxytocinasenachweis im Schwangerenserum
Methode Tuppy und Wintersberger (1960)

(Werte in ml)	Leerwert	Probe
Puffer	2,0	2,0
Aqua tridest.	1,0	0,5
Serum	-	0,5
Gemisch Puffer/Aqua tridest.	0,75	-
Gemisch Puffer/Aqua tridest/Serum	-	0,75
Substrat	0,25	0,25
2 Stunden bei 37 °C inkubieren		
gut mischen, zentrifugieren		
Trichloressigsäure	1,0	1,0
Überstand	1,0	1,0
Aceton-HCl	9,0	9,0
im abgedunkelten Raum (Rotlicht) zugeben		
Natriumnitrit	1,0	1,0
Ammoniumsulfaminat	1,0	1,0
N-(1-Naphthyl-)äthylen- diamin	1,0	1,0
2 Stunden Farbentwicklung im Dunkeln bei 37°C, auftretende Blaufärbung bei 570 nm bestimmen		

Reagenzien:

Pufferlösung	: 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4; 400 ml Puffer werden mit 100 ml Aqua tridest. auf 500 ml verdünnt
Substratlösung	: 135 mg L-Cystin-di-β-Naphthylamid (CBNA) in 100 ml 0,01 n HCl
Aceton-HCl-Gemisch	: 30 ml Aceton mit 60 ml n HCl zusammengeben
Natriumnitrit	: 0,1 % wässrige Lösung, täglich frisch angesetzt
Ammoniumsulfaminat	: 0,5 % wässrige Lösung
N-(1-Naphthyl)- äthylendiamin	: 0,1 % wässrige Lösung
Trichloressigsäure	: 10 % wässrige Lösung

II. Oxytocinasenachweisreaktion im Retroplazentarserum nach der Mikromethode von Seelig (1970)

Die Mikromethode unterscheidet sich von der von Tuppy und Wintersberger (1960) angegebenen in der Konzentration der Reaktionspartner sowie in der Menge des Reaktionsgemisches.

Zur Aufstellung der Eichkurven wurden mehrfach 100 mg β-Naphthylamin in 1000 ml 0,01 M HCl gelöst und arithmetisch mit dem Lösungsmittel verdünnt. Aus den erhaltenen Mittelwerten der gefundenen Extinktionen wurden die Eichkurven gezeichnet (Abb. 3).

Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 570 nm, die Berechnung der μMol gespaltenes CBNA pro ml Serum nach 2 Stunden Inkubation ergab sich aus der Formel

$$\frac{E_{\text{gef.}}}{E_{1/\mu\text{g}}} \times 0,06286 = \mu\text{Mol gesp. CBNA pro ml Serum} / 2 \text{ h}$$

$E_{\text{gef.}}$ entspricht der gemessenen Extinktion der Probe abzüglich der Extinktion des inaktivierten Leerwertes, E_1 hat nach der ermittelten Messung einen Wert von $0,0211$.

$$E_{\text{gef.}} \times 2,99 = \mu\text{Mol gesp. CBNA pro ml Serum} / 2 \text{ h}$$

Als Parameter für die Oxytocinaseaktivitäten wurde der Proteingehalt des Serums genommen. Bei Angabe der Aktivität bezogen auf 1 ml Lösung lassen sich verschiedene Reinheitsgrade von Oxytocinase aktivem Material nur schwer voneinander unterscheiden. Bei Anreicherung der Oxytocinase im Retroplazentarserum wurde die Aktivität in μMol gespaltenes CBNA pro mg Protein bei 2 Stunden Inkubationszeit angegeben.

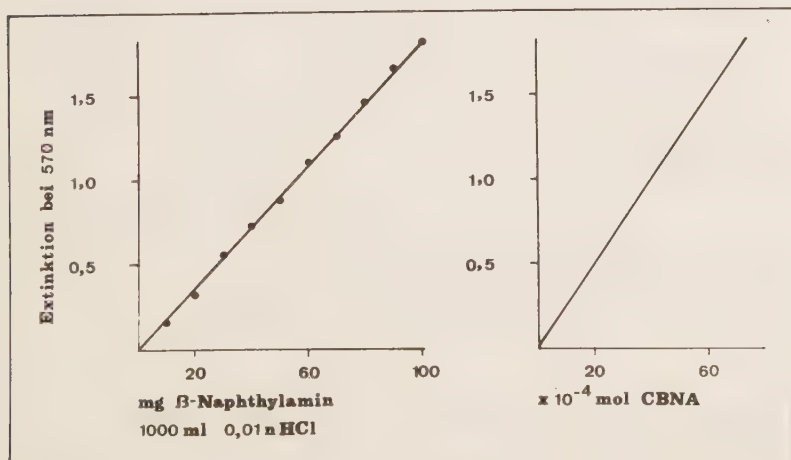


Abb. 3

Extinktion bei 570 nm als Funktion der Konzentration von β -Naphthylamin, Umrechnung in gespaltenes Substrat CBNA bei 2 Stunden Inkubationszeit

Tabelle 2

Reaktionsansatz Oxytocinasenachweis im Retroplazentars-
serum (Mikromethode, Werte in μ l)

	Leerwert	Probe
Puffer	50	50
Aqua tridest	10	-
Serum	-	10
Substrat	20	20
2 Stunden bei 37°C inkubieren		
gut mischen, zentrifugieren		
Trichloressigsäure	100	100
Überstand	20	20
Aceton-HCl	100	100
im abgedunkelten Raum (Rotlicht) zugeben		
Natriumnitrit	10	10
Ammoniumsulfamat	10	10
N-(1-Naphthyl)-äthylen- diamin	10	10
2 Stunden Farbentwicklung im Dunkeln bei 37°C auftretende Blaufärbung bei 570 nm bestimmen		

Reagenzien für die in Tabelle 2 beschriebene Reaktion
siehe Seite 9

III. Histochemische Darstellung der Oxytocinase am Plazentaschnitt mit der von Nachlas et al. (1957) angegebenen Methode

Die im Syncytiotrophoblasten der Plazenta lokalisierte Oxytocinase spaltet vom Substrat (CBNA oder LBNA) das chromogene β -Naphthylamin ab, das mit dem in der Lösung vorhandenen Diazosalz einen unlöslichen Niederschlag bildet.

Das in Isopentan (vorgekühlt in flüssigem Stickstoff) eingefrorene frische Plazentagewebe wurde auf Mikrotomblockhalter gebracht und im Kryostaten zu 10 μ dicken Schnitten bei -20°C verarbeitet.

Die Schnitte wurden auf Oxytocinaseaktivität getestet. Als Substratlösungen wurden L-Cystin-di- β -Naphthylamid und L-Leucin- β -Naphthylamid verwendet. Zur kompetitiven Hemmung der Leucinaminopeptidase (LAP) wurden dem Inkubationsgemisch 10 ml 0,1 M D,L-Methionin hinzugesetzt. Zur Hemmung der Enzymaktivität wurde ein Teil der Schnitte 30 Minuten in 5 % EDTA-Lösung präinkubiert. Reaktionsansatz und Konzentration der Lösungen sind aus Tabelle 3 zu ersehen.

Alle Schnitte wurden in Karion F eingedeckt.

Tabelle 3

Inkubationsgemische zur histochemischen Darstellung
der Oxytocinaseaktivität am Plazentaschnitt

1. CBNA-Substratlösung mit Barbital-

Na-Acetatpuffer auf pH 5,3 eingestellt	11 ml
NaCl	8 ml
KCN	1 ml
Echtgranatsalz GBC	10 mg
2 Stunden bei 37°C inkubieren	

2. LBNA-Substratlösung

	1 ml
Barbital-Na-Acetatpuffer	10 ml
NaCl	8 ml
KCN	1 ml
Echtgranatsalz GBC	10 mg
30 Minuten bei 37°C inkubieren	

Pufferlösung : 0,1 M Barbital-Na-Acetatpuffer
pH 6,5

Substratlösungen

CBNA : $2,75 \times 10^{-3}$ M L-Cystin-di- β -
Naphthylamid (135 mg/50 ml
0,012 n HCl + 50 ml H₂O)

LBNA : $2,73 \times 10^{-2}$ M L-Leucin- β -
Naphthylamid (800 mg / 1000 ml
H₂O)

NaCl : 0,85 % wässrige Lösung

EDTA : 5 % wässrige Lösung

D,L-Methionin : 0,1 M wässrige Lösung

IV. Einfluß der Lagerung auf die Oxytocinaseaktivität

120 ml Schwangerensammelserum wurden in vier Fraktionen bei -80°C , -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ und $+20^{\circ}\text{C}$ unter sterilen Bedingungen gelagert. Je 2 ml Serum wurden in Glasampullen abgefüllt und bis zu 21 Tagen verschlossen aufbewahrt. Die Oxytocinaseaktivitäten wurden täglich bestimmt.

V. Oxytocinaseaktivität im Schwangerenserum nach Lyophilisation, Nachweisreaktion mit der Methode von Tuppy und Wintersberger (1960)

25 ml Schwangerenserum wurden in einem Rundkolben bei -50°C eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Vor und nach der Lyophilisation wurden die Oxytocinaseaktivitäten in je 5 Proben bestimmt.

VI. Lyophilisation und Anreicherung der Oxytocinase im Retroplazentarserum

1. Ammoniumsulfatfällung (Tuppy und Wintersberger 1960)
2. Rivanolfällung (Tuppy und Wintersberger 1960)
3. Chromatographie auf Sephadex G 200 (Sjöholm 1964)

Während der verschiedenen Reaktionsschritte wurde das aktive Material lyophilisiert und mittels der Polyacrylamidgelelektrophorese (Diskelektrophorese) untersucht. Die Oxytocinaseaktivitäten wurden mit der Mikromethode bestimmt.

1. Ammoniumsulfatfällung

500 ml Retroplazentarserum wurden mit 121 g Ammoniumsulfat 10 Minuten bei 0°C verrührt, anschließend eine Stunde bei 0°C zentrifugiert (40 % Sättigung). Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 62 g Ammoniumsulfat 10 Minuten verrührt und mit 15 g Hyflo-Supercel versetzt. 15 g Hyflo-Supercel wurden in einer 60 % Ammoniumsulfatlösung angerührt und auf einen Büchnertrichter gebracht, danach abgesaugt. Durch diese Schicht wurde der Proteinniederschlag unter schwachem Vakuum filtriert. Das klare Filtrat wurde in 300 ml Aqua tridest. aufgeschwemmt und durch Zentrifugieren vom Hyflo-Supercel befreit. Das Sediment wurde zweimal gewaschen. Alle überstehenden Lösungen wurden zusammengegeben, einen Tag gegen Leitungswasser und einen Tag gegen Aqua tridest. dialysiert. Nach Beendigung der Dialyse wurde die Lösung lyophilisiert.

2 g des erhaltenen Materials wurden mit Rivanol gefällt
1 g mit Sephadex G 200 chromatographisch aufgetrennt.

2. Rivanolfällung

2 g des lyophilisierten Materials wurden in 20 ml 0,1 M Tris-Puffer pH 7,4 gelöst und mit Aqua tridest. auf 100 ml aufgefüllt. Unter ständigem Rühren erfolgte ein Zusatz von 20 ml 0,5 % Rivanollösung. Anschließend wurde der Niederschlag 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit weiteren 20 ml 0,5 % Rivanollösung versetzt. Zurück blieb ein gelbbrauner visköser Niederschlag. Dieser Niederschlag wurde in 25 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0 gelöst. 25 ml Aqua tridest. und 5 g

Bentonit wurden zur Entfernung des Rivanols hinzugegeben. Nach Zentrifugation wurde in der überstehenden Lösung noch einmal 5 g Bentonit verrührt. Anschließend wurde das Bentonit abzentrifugiert. Das gesamte Material wurde lyophilisiert, in Aqua tridest. wieder gelöst und gegen das Lösungsmittel 24 Stunden dialysiert.

3. Chromatographie auf Sephadex G 200

1 g des nach der Ammoniumsulfatfällung lyophilisierten Materials wurde in 10 ml 0,1 M Ammoniumbikarbonat gelöst und gegen das Lösungsmittel dialysiert. Danach erfolgte eine chromatographische Auftrennung auf einer Sephadex G 200 Säule (2,5 x 90 cm, Durchflußgeschwindigkeit 15 ml pro Stunde). Fraktionen zu je 10 ml wurden im Fraktionsammler aufgefangen, deren Eiweißgehalt bei 280 nm im Zeiss-Spektralphotometer in 0,5 cm Quarzkuvetten bestimmt wurde.

Die Oxytocinase aktiven Fraktionen wurden zusammengegeben und in einem Rundkolben lyophilisiert.

Die Seren wurden mittels der Diskelektrophorese in der analytischen Trennkammer (Shandon) untersucht: Normalserum (männlich), Retroplazentarserum, Serum nach Ammoniumsulfatfällung, angereichertes Material nach Chromatographie auf Sephadex G 200.

Die Auftragung erfolgte in 7,5 % Acrylamidgel pH 8,9. Die Zusammensetzung des Trenngels entsprach den in Tabelle 4 angegebenen Werten.

Tabelle 4

Diskelektrophorese - Stammlösungen auf 100 ml

1. 1 n HCl	48,0 ml	5. Acrylamid	10,0 g
Tris	36,3 g	Bis	2,5 g
Temed	0,23 ml		
2. Acrylamid	28,0 g	6. Riboflavin	4,0 g
Bis	0,735 g		
3. Persulfat	0,14 g	7. Saccharose	40,0 g
4. 1 n HCl	48,0 ml	Elektrodenpuffer	
Tris	5,98 g	Tris	6,0 g
Temed	0,46 ml	Glycin	28,8 g
		mit H ₂ O auf 1000 ml	
		zum Gebrauch 10 % Lösung	
Tris	= Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan		
Bis	= N,N-Methylenbisacrylamid		
Temed	= Tetramethyläthylendiamin		
Persulfat	= Ammoniumperoxodisulfat		
Sammelgel	: 1 Teil 4, 2 Teile 5, 1 Teil 6, 4 Teile 7		
Trenngel	: 1 Teil 1, 2 Teile 2, 1 Teil H ₂ O, 4 Teile 3		

VII. Einfluß der Lyophilisation auf die histochemische Darstellbarkeit der Oxytocinase

10 μ dicke frische Plazentaschnitte wurden 24 Stunden in der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

Die Oxytocinaseaktivität wurde mit der von Nachlas et al. (1957) angegebenen Methode (Seite 12) dargestellt.

MATERIAL

Alle Reagenzien besaßen p.A.-Qualität, zu Lösungs- und Verdünnungszwecken wurde Aqua tridest. verwendet. Zur pH-Messung wurde ein elektrischer pH-Meter mit jeweils frisch geeichter Glaselektrode benutzt.

Zur photometrischen Bestimmung der Oxytocinaseaktivität wurde der Zeiss-Spektralphotometer PMQ II verwendet. Die Extinktionen wurden bei 570 nm mit Mikroküvetten (1 cm Schichtdicke) gemessen.

Zur serienmäßigen Abfüllung verschiedener Proben wurde ein Mikrodosimeter (Ingold) verwendet, desgleichen Hammiltonspritzen und Eppendorf-Pipetten.

Die Eiweißbestimmung wurde mit der Kjeldahlreaktion (Mikrokjeldahl nach Parnas und Wagner) durchgeführt.

Die Seren und das aktive Material wurden in der WKF L 05 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

Bei der Chromatographie auf Sephadex wurde der Fraktions-sammler LKB ULTRORAC fraction collector Type 7000 verwendet.

Zur Untersuchung der Oxytocinaseaktivität wurde Schwan-gersen serum (mens VIII bis X) und Retroplazentarserum verwendet, sowie frisches Plazentagewebe, das nach Ausstoßung sofort in Isopentan eingefroren und im Kryostat verarbeitet wurde.

ERGEBNISSE

I. Einfluß der Lagerung auf die Oxytocinaseaktivität

Nach 21 Tagen blieb die Oxytocinaseaktivität bei steriler Lagerung des Serums in den Fraktionen -80°C , -20°C und $+4^{\circ}\text{C}$ konstant auf gleicher Höhe. Die Aktivität nahm bei $+20^{\circ}\text{C}$ Lagerungstemperatur kontinuierlich ab und erreichte nach 21 Tagen einen knapp 10 % niedrigeren Wert. (vgl. Tab. 5)

Tabelle 5

Einfluß der Lagerung auf die Oxytocinaseaktivität
($\mu\text{Mol CBNA} / \text{ml Serum} / 2 \text{ h}$)

Lagerungstemperatur	Oxytocinaseaktivität	
	1. Tag	21. Tag
-80°C		0,618
-20°C		0,622
$+ 4^{\circ}\text{C}$	0,627	0,625
$+20^{\circ}\text{C}$		0,565
Vergleich Normalserum (männlich)	0,042	

Da Schwangerensammelserum aus verschiedenen Graviditätsstufen (mens VIII bis X) zur Untersuchung kam, kann keine Angabe über die absolute Höhe der Oxytocinaseaktivität für einen bestimmten Zeitpunkt gegen Ende der Schwangerschaft gemacht werden. Im Vergleich von Serumwerten von männlichem Serum liegen die Meßwerte bezüglich der CBNA-Spaltung um ca. das 15fache höher.

II. Einfluß der Lyophilisation auf die Oxytocinaseaktivität im Schwangerenserum

Die von Tuppy und Wintersberger (1960) beobachtete vollständige Inaktivierung der Oxytocinase nach Lyophilisation konnte nicht bestätigt werden. Der Aktivitätsabfall betrug nach Lyophilisation des unvorbehandelten Serums ca. 3 %. (vgl. Tab. 6)

Tabelle 6

Oxytocinaseaktivität im Schwangerenserum vor und nach Lyophilisation (Werte in $\mu\text{Mol CBNA} / \text{ml Serum} / 2 \text{ h}$)

	vor Lyophilisation	nach Lyophilisation
1.	0,636	0,612
2.	0,602	0,591
3.	0,611	0,584
4.	0,630	0,603
5.	0,622	0,616
Mittelwert	0,623	0,600

III. Einfluß der Lyophilisation auf die Oxytocinaseaktivität im Retroplazentarserum bei verschiedenen Reinigungsstufen

Bei dieser Versuchsreihe wurde die von Seelig (1970) eingeführte Mikromethode zur Bestimmung der Oxytocinaseaktivität im Retroplazentarserum verwendet. Die Aktivität betrug im Ausgangsmaterial (vgl. Tabelle 7) 0,0103 μ Mol CBNA / mg Protein / 2 Stunden Inkubation.

Tabelle 7

Oxytocinaseaktivität im Retroplazentarserum

Proteingehalt mg / ml	Oxytocinaseaktivität μ Mol CBNA / 2 h bezogen auf	
	1 ml Serum	1 mg Serumprotein
49,63	0,517	0,0104
	0,502	0,0101
	0,523	0,0106
	0,499	0,0101
	0,514	0,0104
Mittelwert	0,511	0,0103

Auch hier kam es nicht nach Lyophilisation des unvorbehandelten Serums zu einem Aktivitätsverlust (vgl. Tabelle 8).

Die Aktivitätssteigerung der Oxytocinase nach Ammoniumsulfatfällung betrug das 3,6fache (0,0376 μ Mol CBNA pro mg Protein / 2 Stunden Inkubationszeit) gegenüber dem Ausgangswert im Retroplazentarserum. Es fand sich im verworfenen Überstand nach der Fällung eine Oxytocinaseaktivität von 0,0043 μ Mol CBNA / mg Prot. / 2 h. Bei der Lyophilisation des Ammoniumsulfat gefällten

Tabelle 8

Einfluß der Lyophilisation auf die Oxytocinaseaktivität
im Retroplazentarserum bei verschiedenen Reinigungsstufen

	Proteingehalt mg / ml Serum	Oxytocinaseaktivität 2 h Inkubation	
		/ μ Mol CBNA Pro ml Serum	/ μ Mol CBNA pro 1 mg Se- rumprotein
Retroplazentarserum	49,63	0,511	0,0103
Retroplazentarserum nach Lyophilisation	40,38	0,413	0,0102
Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	12,38	0,466	0,0376
Rivanolfällung	0,605	0,227	0,375
Rivanolfällung und Lyophilisation	0,676	0,254	0,377
Rivanolfällung-Lyophi- sation und Dialyse gegen Aqua tridest.	0,925	0,332	0,359
gesammelte Fraktionen nach Sephadex G 200	0,81	0,118	0,145
Sephadex-Material nach Lyophilisation	2,86	0,407	0,142

Serum ergaben sich 7,7 g vorgereinigtes Material, von dem 2 g mit Rivanol gefällt und 1 g auf Sephadex G 200 weiterverarbeitet wurden.

Nach der Rivanolfällung wurde die Lösung lyophilisiert, es ergaben sich 70 mg aktive Substanz. Die Rivanolfällung brachte eine 10fache Aktivitätssteigerung gegenüber dem Ammoniumsulfat gefällten Ausgangsmaterial (vgl. Tabelle 8). Das bedeutet eine 36fache Steigerung bezüglich der im Retroplazentarserum gemessenen Oxytocinaseaktivität. Die Lyophilisation nach Rivanolfällung hatte keinen Einfluß auf die Aktivität, eine daran anschließende Dialyse gegen Aqua tridest. ließ sie geringfügig abfallen (von 0,377 auf 0,359 $\mu\text{mol CBNA} / \text{mg Prot.} / 2 \text{ h Inkubation}$).

1 g des Ammoniumsulfat gefällten Material wurde auf einer Sephadex G 200 Säule chromatographisch aufgetrennt (Abb. 5).

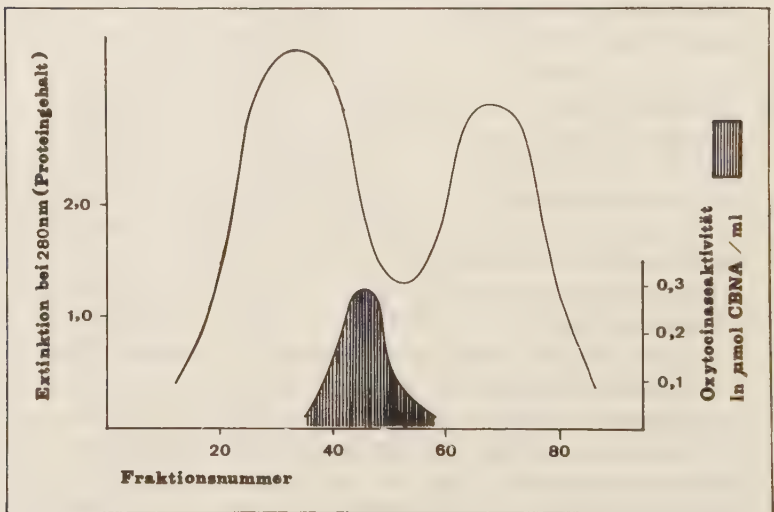


Abb. 5 Chromatographie auf Sephadex G 200

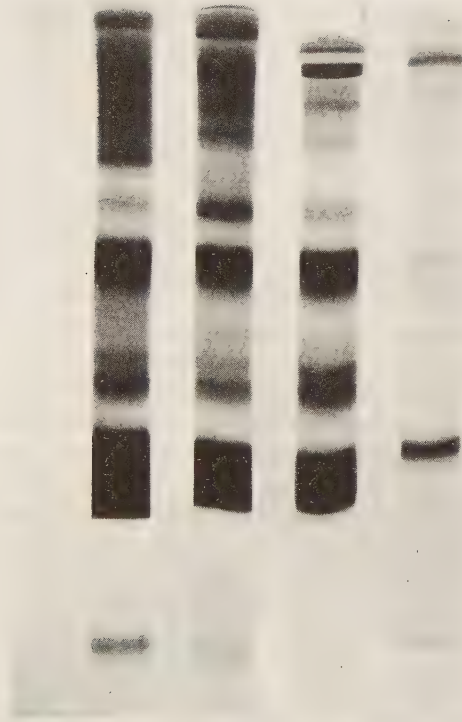


Abb. 4 Diskelektrophorese: Normalserum, Retroplazentar-
serum, Retroplazentarserum nach Ammoniumsulfatfällung,
Serum nach Chromatographie auf Sephadex G 200

Die im Fraktionssammler aufgefangenen Oxytocinase aktiven Fraktionen wurden zusammengegeben und lyophilisiert. 30 mg des erhaltenen Materials wurden in 20 ml 0,04 M Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst und die Oxytocinaseaktivität bestimmt. Die Chromatographie auf Sephadex G 200 brachte gegenüber dem Ammoniumsulfat gefällten Material eine 4fache Aktivitätssteigerung. Gegenüber dem Ausgangsmaterial betrug die Aktivitätszunahme das 15fache. Auch auf dieser Reinheitsstufe konnte eine Minderung der Aktivität nach Lyophilisation nicht festgestellt werden.

IV. Histochemische Darstellung der Oxytocinase am Plazentaschnitt vor und nach Lyophilisation

Bei Verwendung von CBNA- und LBNA-Substratlösungen zeigte sich ein körniger braunroter Farbniederschlag im Syncytiotrophoblasten der Plazenta, der die Bildungsstätte der Oxytocinase markiert. Das fermentfreie Stroma der Zotten blieb gleichmäßig gelb gefärbt. Mit EDTA präinkubierte Schnitte ließen keine Oxytocinasereaktion erkennen. Mit Methionin versehene Inkubationslösungen brachten eine etwas schwächere Farbreaktion durch Hemmung der Leucinaminopeptidase mit sich. Die nach Lyophilisation der Plazentaschnitte ablaufenden Reaktionen führten zu denselben Ergebnissen der Oxytocinasedarstellung. (Abbildungen 6 bis 11). Eine Hemmung und damit eine spezifische Darstellbarkeit der Oxytocinase nach Lyophilisation der Schnitte war nicht zu erreichen (Abb. 9, 11).

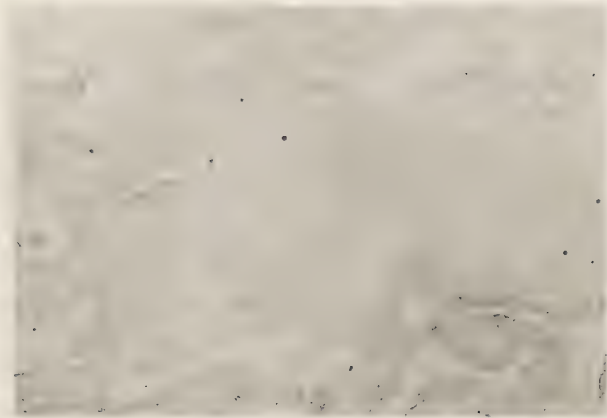


Abb. 6 Menschliche Plazenta, mens X, 125 x. EDTA gehemmte Oxytocinasereaktion, 30 Minuten Inkubation in LBNA-Substratlösung

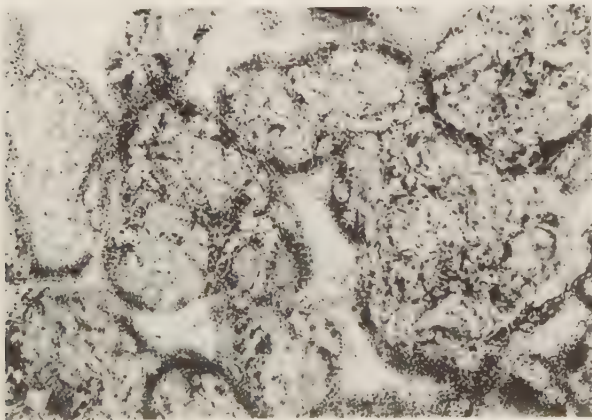


Abb. 7 Menschliche Plazenta, mes X, 300 x. Oxytocinase-darstellung im Syncytiotrophoblasten mit LBNA-Substratlösung, 30 Minuten Inkubation

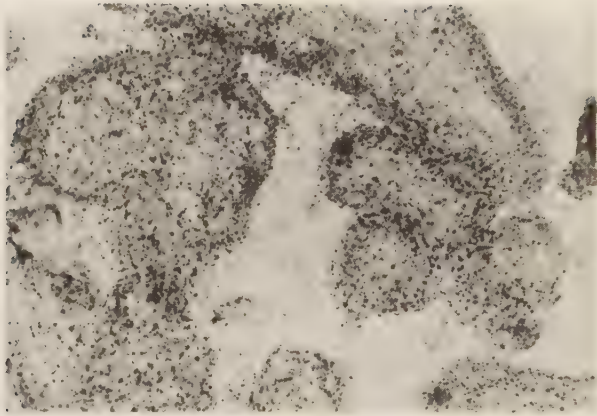


Abb. 8 Menschliche Plazenta, mens X, 300 x. Oxytocinase-
darstellung im Syncytiotrophoblasten mit CBNA-Substrat-
lösung, 2 Stunden Inkubation

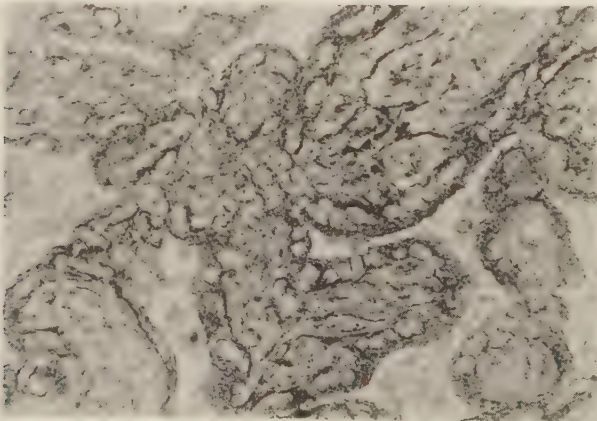


Abb. 9 Menschliche Plazenta, mens X, 300 x. Oxytocinase-
darstellung im Syncytiotrophoblasten nach Lyophilisation
mit CBNA-Substratlösung, 2 Stunden Inkubation

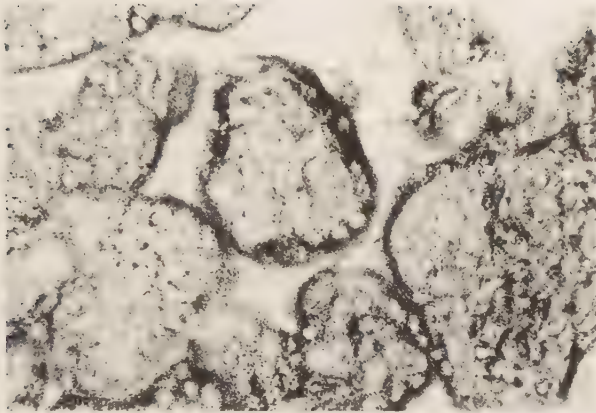


Abb. 10 Menschliche Plazenta, mens X, 300 x. Oxytocinase-
darstellung im Syncytiotrophoblasten mit LBNA-Substrat-
lösung, 30 Minuten Inkubation

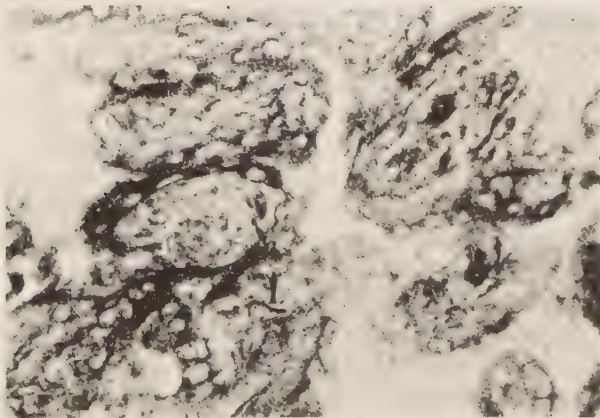


Abb. 11 Menschliche Plazenta, mens X, 300 x. Oxytocinase-
darstellung im Syncytiotrophoblasten nach Lyophilisation
mit LBNA-Substratlösung, 30 Minuten Inkubation

DISKUSSION

Die physiologische Bedeutung des Enzyms Oxytocinase ist bis heute nicht eindeutig bestimmt. Schon Fekete (1930) beschrieb den auffälligen Zusammenhang zwischen Oxytocinase und Schwangerenserum. Später vermuteten Werle und Effkemann (1941), Page (1946), Semm (1955), Dicker und Whyley (1959), Mendez-Bauer et al. (1961) und andere Autoren eine ursächliche Beteiligung der Oxytocinase am Geburtsgeschehen. Die von ihnen aufgestellte Theorie konnte weder begründet noch sicher widerlegt werden: ein plötzliches Absinken der Oxytocinaseaktivität gegen Ende der Schwangerschaft führt zu einem Überschuß an freiem Oxytocin, das die Wehentätigkeit in Gang bringt.

Der Zusammenhang zwischen normal ablaufender Schwangerschaft und Oxytocinaseaktivität wird heute von den meisten Autoren nicht bestritten. Semm und Bernhard (1963) fanden bei Schwangerschaftstoxikose eine deutlich erniedrigte Oxytocinaseaktivität. Insbesondere beim Fehlen der sonst üblichen Aktivitätszunahme in den letzten Schwangerschaftswochen wird eine toxische Schädigung der Plazenta angenommen. Semm (1963) konnte aber auch zeigen, daß zwischen Tragzeit, Geburtsgewicht der Frucht und Plazentagewicht kein signifikantes Verhältnis zur Oxytocinaseaktivität besteht. Die größte Fermentaktivität findet sich im Bereich der für die genannten Größen geltenden Normwerte.

Bruijkere (1968) sieht die Oxytocinaseaktivität im Schwangerenserum als einen Hinweis für die Plazentafunktion im dritten Trimester der Schwangerschaft an. Fälle von intrauterinem Fruchttod werden bei Schwangerschaftsverläufen beschrieben, bei denen die Oxytocinaseaktivität vor der 37. Woche abnahm. Frauen mit niedrigen Oxytocinasewerten entwickelten kleine Früchte, von

denen einige bei Geburt schwer asphyktisch waren. Dagegen konnten keine Plazentainsuffizienzen bei einer Gruppe von Frauen festgestellt werden, deren Oxytocinaseaktivität erst nach der 37. Woche abfiel oder bis zur Geburt kontinuierlich anstieg.

Babuna und Yenen (1966) beschreiben den Zusammenhang von missed abortion und Oxytocinaseaktivität: ein rapider Abfall bei aufeinanderfolgenden Untersuchungen zeigt einen sofortigen Wehenbeginn an, gleichmäßig hohe Werte sprechen für verzögerte Wehen oder Retention der abgestorbenen Frucht. Sehr hohe Serumwerte lassen eine Mehrfachschwangerschaft vermuten.

Für die physiologische Bedeutung der Oxytocinase bei Wehenbeginn ist die Entdeckung von Semm (1967) bedeutsam: Desaminooxytocin wird von Oxytocinase nicht inaktiviert und ist für die Geburtseinleitung besser geeignet als natürliches Oxytocin.

Die Oxytocinase kann nicht nachgewiesen werden im Serum von Männern, im Fetalblut oder bei Chorioncarcinom. Der Bildungsort ist mit Sicherheit die Plazenta, insbesondere der Syncytiotrophoblast.

Der prinzipiell gleiche Oxytocinabbau durch Schwangeren- oder Retroplazentarserum und Aminopeptidasen läßt die Annahme zu, daß die im Serum schwangerer Frauen vorkommende Oxytocinase ein proteolytisches Ferment mit der Spezifität einer Aminopeptidase ist (Tuppy und Nesvadba 1957). Die Oxytocinase hat eine breite Spezifität bezüglich der Fähigkeit zu hydrolysieren (Sjöholm und Yman 1967): neutrale, aromatische, basische und saure N-terminale Aminosäuren von Peptiden.

Das relativ unspezifische Hydrolysevermögen führt zur Schwierigkeit geeigneter Substratwahl für in vitro Versuche. Das hochgereinigte Enzym spaltet einige Aminosäure- β -Naphthylamide, wobei die Hydrolysegeschwindigkeit sehr unterschiedlich ist.

L-Cystin-di- β -Naphthylamid (CBNA) wird im Gegensatz zu L-Leucin- β -Naphthylamid (LBNA) durch die Oxytocinase sehr viel langsamer, dafür aber stärker hydrolytisch gespalten und ist deshalb für die Bestimmung der Oxytocinaseaktivität am besten geeignet. (Tuppy und Nesvadba 1957)

Der Befund, daß L-Cystinyl-di-L-Tyrosinamid, ein dem aminoterminalen Teil der Aminosäuresequenz des Oxytocins nachgebildetes Peptid, von der Oxytocinase gespalten wird, und als kompetitives Substrat die Einwirkung dieses Enzyms sowohl auf CBNA als auch Oxytocin zu hemmen imstande ist, wird als weiteres Argument für die Ansicht gewertet, daß die Oxytocinase die Spezifität einer Aminopeptidase hat (Wintersberger, Tuppy und Stoklaska 1960). Aufgrund des vielfachen Hydrolysevermögens wäre es besser, die Oxytocinase als α -Aminopeptid-Aminosäurehydrolase zu bezeichnen (Sjöholm 1967). Die Oxytocinase wird durch Komplexbildner gehemmt, z.B. durch Äthylendiamin-tetraessigsäure (EDTA). Es handelt sich dabei um eine reversible Zeitreaktion, die durch Dialyse zu 60 % umkehrbar ist. Die Komplexbildner Citrat, Oxalat und Pyrophosphat haben keinen Einfluß auf die Oxytocinaseaktivität (Tuppy und Wintersberger 1960). Werle und Semm (1956) erreichten eine Reaktivierung mit Co, Mn und Zn nach Inaktivierung durch Komplexbildner.

Wird Schwangerenserum auf vertikaler Stärkegelelektrophorese bei pH 8,5 untersucht, so erscheinen drei verschiedene Banden: die am schnellsten laufende ist LAP, vorkommend auch im Serum Nichtschwangerer, die beiden anderen sind Oxytocinasebanden: CAP₁ und CAP₂. Bei horizontaler Anordnung erscheint nur eine Oxytocinasebande. Gleiche Ergebnisse zeigt die Polyacrylamidelektrophorese (Diskelektrophorese). Bei physiologischem pH fallen die beiden Oxytocinasebanden zusammen. CAP₁ und CAP₂ stehen im pH abhängigen Gleichgewicht und können deshalb ineinander überführt werden. Die unterschied-

liche pH abhängige Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld wird durch zwei verschiedene Molekülkonfigurationen erklärt (Sjöholm 1964): CAP_2 ist die geschlossene Form mit elektrostatischen Brücken zwischen negativen Carboxylgruppen der Neuraminsäure (ein Bestandteil des Oxytocinasmoleküls) und positiven Proteingruppen. Wird CAP_2 in CAP_1 überführt, werden die Bindungen gelöst. Durch Neuraminidase kann Neuraminsäure aus dem Molekülverband abgespalten werden. Die Neuraminsäure ist verantwortlich für die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, nicht für die Aktivität bezüglich des Oxytocinabbaus.

Es empfiehlt sich, Oxytocinase aktives Material im Kühlschrank zu lagern. Unsere Untersuchungen ergaben konstante Aktivitäten bei Lagerung zwischen $-20^{\circ}C$ und $+4^{\circ}C$ nach drei Wochen. Tuppy und Wintersberger (1960) beschreiben dieselben Ergebnisse und stellten fest, daß 20 Minuten andauerndes Erhitzen auf $50^{\circ}C$ weniger als 10 % der Aktivität zerstört. Unsere Untersuchungen zeigten einen Temperatur abhängigen Aktivitätsverlust bei dreiwöchiger steriler Lagerung bei $+20^{\circ}C$, der knapp 10 % betrug.

Bei Anreicherung der Oxytocinase im Retroplazentars serum konnten - unter Einbeziehung der Lyophilisation - dieselben Ergebnisse, wie von Tuppy und Wintersberger (1960) beschrieben, erzielt werden. Die Ammoniumsulfatfällung brachte eine 3,6fache, die Rivanolfällung eine 10fache Aktivitätssteigerung. Nach Chromatographie auf Sephadex G 200 stieg die Oxytocinaseaktivität, wie von Sjöholm (1964) angegeben, um das 4fache gegenüber dem Ausgangsmaterial (hier Ammoniumsulfat gefälltes Serum).

Zwischen den einzelnen Arbeitsgängen wurden die Seren

lyophilisiert. Dadurch bestand die Möglichkeit, ohne große Flüssigkeitsmengen auszukommen und bei Mißlingen eines Reaktionsschrittes auf absolut gleichwertiges und vergleichbares Material zurückzugreifen, das ohne Aktivitätsverlust im Kühlschrank gelagert werden konnte.

Tuppy und Wintersberger (1960) fanden eine vollständige Inaktivierung der Oxytocinase durch Lyophilisation von hochgereinigtem Material.

In mehrfach wiederholten Versuchen konnten wir einen Aktivitätsverlust nach Lyophilisation weder im unvorbehandelten Schwangeren- oder Retroplazentarserum noch in angereicherten Oxytocinaselösungen feststellen, der höher als 3 % lag.

Lyophilisation (Gefriertrocknung) bedeutet schonende Vakuumtrocknung von wasserhaltigem Material. Es finden dabei nur geringfügige Schrumpfungsprozesse statt, da das Eis verdampft, ohne vorher zu schmelzen (sublimiert). Das rasche Abkühlen auf möglichst tiefe Temperaturen (-50°C) führt zu sofortigem Einfrieren des Gewebewassers, welches ohne Kristallisation in einen glasförmigen Zustand übergeht. Bei der Kristallbildung kommt es (Bewegungs und Zeit abhängig) zu einem geordneten Einbau der Moleküle. Während des schlagartigen Einfrierens wird Bewegungsenergie schneller entzogen, als die Moleküle Zeit haben, sich zu einem Kristallgitter anzuordnen. Die entstandene glasartige unterkühlte Schmelze wird in einer druckfesten Trocknungskammer bei Hochvakuum gefriergetrocknet. Zurück bleibt festes Material, das keiner weiteren Behandlung bedarf. Das so erhaltene Material kann danach in Wasser, Puffer oder einer anderen Flüssigkeit gelöst werden, ohne daß dabei charakteristische Eigenschaften des Ausgangsmaterials verloren gehen.

Eine geringe Aktivitätseinbuße fanden Doyle (1948)

und Berenbom et al. (1952) nach Lyophilisation von alkalischer und saurer Phosphatase sowie für die Succinodehydrogenase.

Hanson, Gläßer und Kirschke (1964) beschreiben für die Leucinaminopeptidase Lyophilisationsfolgen. Gleichzeitig wird eine drei Monate andauernde Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ für einen 40 % Aktivitätsverlust verantwortlich gemacht. Ob die Aktivitätseinbuße allein zu Lasten der Lyophilisation geht, bleibt dabei unklar, da die Komponenten Lagerung und Temperaturabhängigkeit des Enzyms in die Überlegungen einbezogen werden müssen.

Der histochemische Nachweis der Oxytocinase am Plazentaschnitt erfolgt am sichersten durch die von Nachlas et al. (1957) beschriebene Methode. Die Schnitte werden mit einer Lösung inkubiert, die ein Aminosäure- β -naphthylamid als Enzymsubstrat und ein Diazoniumsalz enthält. Das β -Naphthylamin, das aus dem Substrat unter Einwirkung der Oxytocinase freigesetzt wird, kupelt mit dem Diazoniumsalz zu einem unlöslichen Farbstoff. Die Stellen der Farbstoffablagerung bezeichnen die Lokalisation der Enzymaktivität. Wegen der breiten Spezifität der Substrate (CBNA und LBNA), wird auch die Leucinaminopeptidaseaktivität erfaßt, die durch selektive Hemmung mit D,L-Methionin unterdrückt werden kann. Bei Inkubation mit 5 % EDTA wird die Oxytocinaseaktivität gehemmt.

Auch am histologischen Schnitt konnte keine signifikante Aktivitätseinbuße oder vollständige Hemmung der Oxytocinase durch Lyophilisation gefunden werden. So kann die Lyophilisation nicht zu einer spezifischen Darstellung der Oxytocinase im histologischen Schnitt herangezogen werden.

Durch Lyophilisation von histologischem Material können Nachteile der einfachen Fixation vermieden werden.

Diese sind:

1. Verlust von Protein und organischem oder anorganischem Material durch Herauslösung aus dem Gewebe
2. Die Denaturierung und Ausfällung der Eiweißkörper
3. Die Diffusion bzw. Aggregation einzelner Zellbestandteile
4. Die chemische Veränderung aktiver Gruppen und die Inaktivierung der Enzyme

Aufgrund der von Tuppy und Wintersberger (1960) nachgewiesenen Inaktivierung hochgereinigter Oxytocinase durch Lyophilisation wurde in dieser Arbeit untersucht, bis zu welchen Reinigungsgraden eine Lyophilisation ohne Aktivitätseinbuße des Enzyms durchgeführt werden kann. Ferner interessierte die Frage, ob eine Lyophilisation zu einer Hemmung und damit wenigstens indirekten spezifischen Nachweisbarkeit der Oxytocinase im Gewebe führen kann.

Das große unspezifische Hydrolysevermögen der Oxytocinase, das sich möglicherweise auch gegen andere körpereigene Peptide als Oxytocin und Vasopressin richtet (z.B. Calcitonin vgl. Seelig und Lassen 1971), machen Untersuchungen der Oxytocinasewirkungen auf breiterer Basis notwendig. Nach unserer Überzeugung bringt die Anwendung der Lyophilisation bei Reindarstellung und Serienuntersuchungen Vorteile (kleinste Mengen an Flüssigkeit und Trockensubstanz) mit sich, auf die nicht verzichtet werden sollte.

Die unbestrittene Beteiligung der Oxytocinase an der Schwangerschaft macht ferner eine spezifische histochemische Darstellbarkeit der Oxytocinase im Syncytiotrophoblasten der Plazenta notwendig, um sie bei pathologischen Störungen besser erfassen zu können.

Eine solche spezifische Reaktion ist vermutlich nur mit Oxytocinaseantikörpern möglich, was eine Reindarstellung der Oxytocinase zur Immunisierung voraussetzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung kam Schwangerensammelserum (mens VIII bis X). Die Seren wurden in vier Fraktionen (-80°C , -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ und $+20^{\circ}\text{C}$) drei Wochen steril gelagert. Die Oxytocinaseaktivitäten wurden täglich bestimmt. Die Aktivitäten der Gruppen -20°C und $+4^{\circ}\text{C}$ blieben über die gesamte Zeit konstant, Lagerung bei -80°C brachte einen geringfügigen, bei $+20^{\circ}\text{C}$ knapp 10 %igen Aktivitätsabfall.

Entgegen der Angaben von Tuppy und Wintersberger (1960) führte die Lyophilisation des Serums nicht zu vollständiger Inaktivierung der Oxytocinase. Die Aktivitätseinbuße lag bei maximal 3 %.

Bei Anreicherung der Oxytocinase aus Retroplazentars serum brachte die zwischen den Reinigungsschritten durchgeführte Lyophilisation eine Arbeitserleichterung durch Reduzierung großer Flüssigkeitsmengen auf kleinste Mengen Trockensubstanz mit sich.

Durch die von Seelig (1970) eingeführte Mikromethode zur Bestimmung der Oxytocinaseaktivität konnten bei Reihenuntersuchungen viele Meßwerte in relativ kurzer Zeit bei großer Genauigkeit erzielt werden.

Die histochemische Darstellung der Oxytocinase am frischen Plazentaschnitt brachte vor und nach Lyophilisation dieselben Ergebnisse: ein fein- oder grobkörniger Farbniederschlag markiert die Lokalisation des Enzyms im Syncytiotrophoblasten der Plazenta.

LITERATURVERZEICHNIS

- BABUNA,C.; YENEN,E.: Further studies on serum oxytocinase in pathologic pregnancy
Am. J.Obst. Gynec., 94,6, S.868-875 (1966)
- BALASZ,A.;BIENIASZ,A.; DREWNIAK,K.: Effect of oxytocinase in some biochemical components in the blood of parturient and puerperal women.
Kazan. Med.Zh. 1967 (6),50-2 (Russ)
- BERENBOM(1952) Zitat in Handbuch der Histochemie
VII,1, S.13, G. Fischer Verlag Stuttgart (1960)
- BERNHARD,J.: Die Serumoxytocinase-Aktivität im Blut und in der Placenta am Ende der Tragzeit
Zbl. Gynaek. 89,22,785-788 (1967)
- BRATTON,A.C.; MARSHALL,E.K.: New coupling component for sulfanilamide determination.
J.Biol. Chem. 128, 537-50, (1939)
- BRUIJCKERE Rh de Nederl: Oxytocinase activity of the blood as a test of placental function in the 3d trimester of pregnancy.
T Geneesk 112, 2314-9, 21 Dec 68 (Dut)
- BURSTONE,M.S.; FOLK,I.E.: Histochemical demonstration of aminopeptidase.
J.Histochem.Cytochem. 4,217,(1956)
- DICKER,S.E.; WHYLEY,G.A.: Inactivation of oxytocin by plasma of pregnant women.
J.Obstet. Gynaec.Brit.EMP.66,605 (1959)
- DOYLE (1948) Zitat in Handbuch der Histochemie
VII,1,S. 13, G. Fischer Verlag,Stuttgart (1960)
- FEKETE,K.: Beiträge zur Physiologie der Gravidität.
Endokrinologie, Bd.7,5,364-369 (1930)
- FEKETE,K.: Gibt es während der Schwangerschaft ein aktives Hypophysenhinterlappenhormon
Endokrinologie, Bd.10, 1/2,16-23 (1932)

- GREEN, M.N.; TSOU, K.G.; BRESSLER, R.; SELIGMAN, A.M.: The Colorimetric Determination of Leucine Amino-peptidase Activity with L-Leucyl- β -Naphthylamide Hydrochloride. Arch.Biochem. Biophys. 57, 458-474 (1955)
- GORMORI, G.: Chromogenic substrates for aminopeptidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 559-61, (1954)
- HANSON, H.; GLÄSER, D.; KIRSCHKE, H.: Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen. Hoppe-Seyler 340, 126 (1965)
- KLAUS, D.: Die diagnostische Bedeutung von Serumfermentbestimmungen unter besonderer Berücksichtigung der Serumaminopeptidasen. Med.Welt 12, 644-50 (1962)
- KLIMEK, R. et al.: Blood levels of Cystine aminopeptidase (oxytocinase) in patients with toxic and simple goiter. Clin.Chim.Acta 22:491-5, Dec.68
- KLIMEK, R. et al.: Further studies on the oxytocin-oxytocinase system. Amer.J.Obstet Gynec 105:427-30 Oct.69
- KRETSCHMER, K.; HANSON, H.: Kristallisierte Leucinamino-peptidase aus Rinderaugenlinsen. Hoppe-Seyler 340, 107 (1965)
- MATHUR, V.S.; WALKER, J.M.: Oxytocinase in Plasma and Placenta in Normal and Prolonged Labour. Brit. med.J., 3, 96-97 (1968)
- MENDEZ-BAUER, C.J.; CARBALLO, M.A.; CABOT, H.M.; NEGREIROS DE PAIVA, C.E.; GONZALES-PANIZZA, V.H.: Studies on plasma oxytocinase. In Oxytocin S. 325, edited by CALDEYRO-BARCIA, R. und HELLER, H., Pergamon Press (1961)

- MÜLLER-HARTBURG, W.; NESVADBA, H.; TUPPY, H.: Die Anwendung einer chemischen Methode zur Bestimmung des Oxytocinasespiegels im Schwangersenserum.
Arch. Gynaek. 191, 442 (1959)
- NACHLAS, M.M.; CRAWFORD, D.T.; SELIGMAN, A.M.: The Histochemical Demonstration of Leucine Amino-peptidase.
J.Histochem. Cytochem. 5, 264-278 (1957)
- NACHLAS, M.M.; GOLDSTEIN, T.P.; SELIGMAN, A.M.: An Evaluation of Amino-peptidase Specificity with Seven Chromogenic Substrates.
Arch. Biochem. Biophys. 97, 223-231 (1962)
- PAGE, E.W.: The Value of Plasma Pitocinase Determinations in Obstetrics.
Am. J. Obst. Gynec. 52, 1014-1021 (1946)
- PAGE, E.W.: A Blood Test for Estimating the Week of Pregnancy.
Science 105, S. 292-293 (1947)
- PAGE, E.W.; TITUS, M.A.; MOHUN, G.; GLENDENING, M.B.: The Origin and Distribution of Oxytocinase
Am. J. Obst. Gynec. 82, 5, 1090-95 (1961)
- RYDEN, G.: Cystine Amino-peptidase and Oxytocinase Activity in Pregnancy.
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 45, 3, (1966)
- SEELIG, H.P.: Mikromethode zur Bestimmung der Cystinamino-peptidase (Oxytocinase).
Klin. Wschr. 48, 567-569 (1970)
- SEELIG, H.P.; LASSEN, E.: Die Beeinflussung der TCA-Calci-tonininaktivität durch Retroplazentarserum und Cystinamino-peptidase (Oxytocinase).
Z. ges. exp. Med. 154, 265-73 (1971)

- SEELIG, H.P.; ROEMHELD, R.: Untersuchungen zur histochemischen Lokalisation der Leucin- und Cystinaminopeptidase (Oxytocinase) in der Plazenta.
Histochemie 18, 30-39 (1969)
- SEMM, K.: Die klinische Bedeutung der Oxytocinasebestimmung.
Klin. Wschr. 33, 817 (1955)
- SEMM, K.: Die Bildungsstätte der Serumoxytocinase.
Arch. Gynaek. Bd. 191, 57-64 (1958)
- SEMM, K.: Die Konzentration der Serum-Oxytocinase am Ende der Tragzeit.
Zbl. Gynaek. 84, 1665-1669 (1962)
- SEMM, K.: Serum-Oxytocinase-Aktivität in der Placenta,
Arch. Gynaek. 199 (3), 265-70 (1963)
- SEMM, K.: Desamino-Oxytocin, ein von Schwangerenblut nicht inaktivierbares Wehenhormon.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 27, 1, S. 36-42 (1967)
- SEMM, K.; BERNHARD, J.: Zur Diagnostik des placentaren Stoffwechsels durch die Serum-Oxytocinase Bestimmung im mütterlichen Blut.
Arch. Gynaek. 199, 271-278 (1963)
- SJÖHOLM, I.: Enzymatic Inactivation of Oxytocin.
Acta Chem. Scand. 18, 4, 889-98 (1964)
- SJÖHOLM, I.: Biochemical studies on oxytocin and oxytocinase.
Acta Pharm. Suecica 4, 2, 81-96 (1967)
- SJÖHOLM, I.; YMAN, L.: Preparation of highly purified oxytocinase (cystine aminopeptidase) from retroplacental serum.
Acta Pharm. Suecica 3, 6, 377-88 (1966)
- SJÖHOLM, I.; YMAN, L.: Elektrophoretic studies on oxytocinase (cystine aminopeptidase).
Acta Pharm. Suecica 3, 6, 389-96 (1966)

- MÜLLER-HARTBURG, W.; NESVADBA, H.; TUPPY, H.: Die Anwendung einer chemischen Methode zur Bestimmung des Oxytocinasespiegels im Schwangersenserum.
Arch. Gynaek. 191, 442 (1959)
- NACHLAS, M.M.; CRAWFORD, D.T.; SELIGMAN, A.M.: The Histochemical Demonstration of Leucine Aminopeptidase.
J.Histochem. Cytochem. 5, 264-278 (1957)
- NACHLAS, M.M.; GOLDSTEIN, T.P.; SELIGMAN, A.M.: An Evaluation of Aminopeptidase Specificity with Seven Chromogenic Substrates.
Arch. Biochem. Biophys. 97, 223-231 (1962)
- PAGE, E.W.: The Value of Plasma Pitocinase Determinations in Obstetrics.
Am. J. Obst. Gynec. 52, 1014-1021 (1946)
- PAGE, E.W.: A Blood Test for Estimating the Week of Pregnancy.
Science 105, S. 292-293 (1947)
- PAGE, E.W.; TITUS, M.A.; MOHUN, G.; GLENDENING, M.B.: The Origin and Distribution of Oxytocinase
Am. J. Obst. Gynec. 82, 5, 1090-95 (1961)
- RYDEN, G.: Cystine Aminopeptidase and Oxytocinase Activity in Pregnancy.
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 45, 3, (1966)
- SEELIG, H.P.: Mikromethode zur Bestimmung der Cystinaminopeptidase (Oxytocinase).
Klin. Wschr. 48, 567-569 (1970)
- SEELIG, H.P.; LASSEN, E.: Die Beeinflussung der TCA-Calci-toninaktivität durch Retroplazentarserum und Cystinaminopeptidase (Oxytocinase).
Z. ges. exp. Med. 154, 265-73 (1971)

- SEELIG, H.P.; ROEMHELD, R.: Untersuchungen zur histochemischen Lokalisation der Leucin- und Cystinaminopeptidase (Oxytocinase) in der Plazenta.
Histochemie 18, 30-39 (1969)
- SEMM, K.: Die klinische Bedeutung der Oxytocinasebestimmung.
Klin. Wschr. 33, 817 (1955)
- SEMM, K.: Die Bildungsstätte der Serumoxytocinase.
Arch. Gynaek. Bd. 191, 57-64 (1958)
- SEMM, K.: Die Konzentration der Serum-Oxytocinase am Ende der Tragzeit.
Zbl. Gynaek. 84, 1665-1669 (1962)
- SEMM, K.: Serum-Oxytocinase-Aktivität in der Placenta:
Arch. Gynaek. 199 (3), 265-70 (1963)
- SEMM, K.: Desamino-Oxytocin, ein von Schwangerenblut nicht inaktivierbares Wehenhormon.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 27, 1, S. 36-42 (1967)
- SEMM, K.; BERNHARD, J.: Zur Diagnostik des placentaren Stoffwechsels durch die Serum-Oxytocinase Bestimmung im mütterlichen Blut.
Arch. Gynaek. 199, 271-278 (1963)
- SJÖHOLM, I.: Enzymatic Inactivation of Oxytocin.
Acta Chem. Scand. 18, 4, 889-98 (1964)
- SJÖHOLM, I.: Biochemical studies on oxytocin and oxytocinase.
Acta Pharm. Suecica 4, 2, 81-96 (1967)
- SJÖHOLM, I.; YMAN, L.: Preparation of highly purified oxytocinase (cystine aminopeptidase) from retroplacental serum.
Acta Pharm. Suecica 3, 6, 377-88 (1966)
- SJÖHOLM, I.; YMAN, L.: Elektrophoretic studies on oxytocinase (cystine aminopeptidase).
Acta Pharm. Suecica 3, 6, 389-96 (1966)

- SJÖHOLM, I.; YMAN, L.: Degradation of oxytocin, lysine vasopressin, angiotensin II, and angiotensin II amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase)
Acta Pharm. Suecica 4,2, 65-76 (1967)
- SMITH, E.E.; RUTENBURG, A.M.: Studies of serum aminopeptidase in pregnancy, hydatidiform mole, and choriocarcinoma.
Am. J. Obst. Gynec. 96,3, 301-304 (1966)
- STOKLASKA, E.; WINTERSBERGER, E.: Mechanismus des Oxytocinabbaus durch Schwangerenserum.
Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 236, S. 358-64 (1959)
- TITUS, M.A.; REYNOLDS, D.R.; GLENDENING, M.B.; PAGE, E.W.: Plasma aminopeptidase activity (oxytocinase) in pregnancy and Labour.
Am. J. Obst. Gynec. 80, 1124-8 (1960)
- TUPPY, H.: The amino acid sequence in oxytocin.
Biochem. Biophys. Acta 11, 449, (1953)
- TUPPY, H.; NESVADBA, H.: Über die Aminopeptidase-Aktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren.
Mh. Chem. 88, 977-988 (1957)
- TUPPY, H.; WINTERSBERGER, E.: Investigations of Pregnancy Serum Oxytocinase. in: Oxytocin, Vasopressin and their Structural Analogues.
Edited by J. RUDINGER, Pergamon Press, Vol. 10, S. 143-151 (1964)
- TUPPY, H.; WIESBAUER, U.; WINTERSBERGER, E.: Über die Einwirkung von Neuraminidase auf die Serumoxytocinase.
Mh. Chem. 94, 1, 321-328 (1963)
- TUPPY, H.; WINTERSBERGER, E.: Reinigung und Eigenschaften der Serumoxytocinase.
Mh. Chem. 91, 1001-1010 (1960)

- DU VIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; SWAN, J.; ROBERTS, C.W.;
KATSOYANNIS, P.G.; GORDON, S.: The Synthesis
of an octapeptide amide with hormonal activity of oxytocin.
J. Amer. Chem. Soc. 75, 4879 (1953)
- DU VIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; TRIPETT, S.: The sequence of
amino acids in oxytocin, with a proposal
for the structure of oxytocin.
J. Biol. Chem. 205, 949 (1953)
- WEINGOLD, A.B.: Enzymic indices of fetal environment.
Clin. Obstet. Gynecol. 11, 4, 1081-1105 (1968)
- WERLE, E.; EFFKEMANN, G.: Über die oxytocinabbauende Fähigkeit
des Schwangerenblutes.
Arch. Gynaekol. 171, 286-290 (1941)
- WERLE, E.; HEVELKE, A.; BUTHMANN, K.: Zur Kenntnis des oxyto-
cinabbauenden Prinzips des Blutes.
Biochem. Z., 309, 270-282 (1941)
- WERLE, E.; SEMM, K.: Aktivitätsbestimmung der Serumoxyto-
cinase als Schwangerschaftsnachweis.
Klin. Wschr. 29, 544, (1951)
- WERLE, E.; SEMM, K.: Über die Oxytocinase des Schwangeren-
blutes.
Arch. Gynaek. 187, 449-457 (1956)
- WINTERSBERGER, E.; MÜLLER-HARTBURG, W.; TUPPY, H.: Eine ein-
fache Methode zur chemischen Bestimmung der
Oxytocinaseaktivität in Schwangerenserum.
Clin. Chim. Acta. Vol. 14, 6, 786-792 (1966)
- WINTERSBERGER, E.; TUPPY, H.; STOKLASKA, E.: Über ein kom-
petitives Substrat der Oxytocinase.
Mh. Chem. 91, 3, 577-581 (1960)

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bin ich Herrn Professor Dr. med. V. Becker zu großem Dank verpflichtet. Ebenso danke ich Herrn Dr. med. H.P. Seelig für die wertvollen Anregungen zu der vorliegenden Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 6.10.1945 wurde ich als zweites Kind des Dr. med. Ortwin Römhild und seiner Ehefrau Barbara, geb. Dieck, in Zeuthen/Berlin geboren.

Meine Schulzeit verbrachte ich in Berlin, Celle und Hamburg, wo ich 1965 am Bismarck-Gymnasium die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1965 begann ich das Medizinstudium in Berlin an der Freien Universität. 1966 legte ich die naturwissenschaftliche und 1967 die ärztliche Vorprüfung ab. Am 12.2.1971 habe ich die ärztliche Prüfung bestanden.

Zur Zeit bin ich Medizinalassistent im Rudolf-Virchow-Krankenhaus in Berlin

